

審査の結果の要旨

氏名 細江 隼

【研究1 インスリン受容体遺伝子の **fibronectin type III domain** の変異により惹起された著明なインスリン抵抗性】

インスリン受容体 (*INSR*) 遺伝子はインスリンの作用発現の第一段階において重要な遺伝子であり、同遺伝子の変異によって著明なインスリン抵抗性が惹起される。同遺伝子の変異に伴う疾患には、重症度の異なる複数の臨床病型が存在することが知られている。同遺伝子の **fibronectin type III domain (FnIII)** には、インスリンとの **binding site** および受容体前駆体のプロセシング部位が存在し、結晶構造を用いた解析により、同遺伝子とインスリンとの結合様式の一部が解明されてきた。本研究は、同遺伝子における稀少で効果の大きい遺伝因子を包括的に解析するため、サンガー法に加えて全エクソームシーケンス (WES) やアレイ CGH (comparative genomic hybridization) を使用した解析を行い、また **FnIII** の重要性を検討するために *INSR* 遺伝子の変異箇所のドメインと重症度の関連について解析し、さらに **FnIII** に存在した最重症臨床病型の原因変異について *INSR* 遺伝子の **mutant** を作成し、CHO 細胞に発現させてタンパク質の機能への影響を評価したものであり、下記の結果を得ている。

1. 著明なインスリン抵抗性を認める4症例を解析対象とし、サンガー法による *INSR* 遺伝子の解析に加えて、一部の症例については WES およびアレイ CGH を使用して遺伝因子の解析を行った。いずれの検体についても *INSR* 遺伝子における新規の変異を同定し、そのうち1検体では同遺伝子のエクソン2を含む **gross deletion** が同定された。
2. 本研究で同定した *INSR* 遺伝子の変異と、オンラインデータベースから収集した同遺伝子の変異を使用して、変異の存在する箇所のタンパク質ドメインの統計学的なエンリッチメント解析を行い、最重症臨床病型である **Leprechaunism** の原因変異が、同遺伝子におけるプロセシング部位およびインスリンとの **binding site** を含む **FnIII** に集積していることを示した。
3. 本研究で同定された最重症臨床病型の原因変異が **FnIII** に存在しており、この変異に関して *INSR* 遺伝子の **mutant** を作成し、CHO 細胞で一過性発現させ、ウェスタンブロットを行った。結果として、前駆体から  $\alpha \cdot \beta$  サブユニットへのプロセシング、インスリン受容体の自己リン酸化、Akt リン酸化のいずれも障害されており、**FnIII** の一部変異によるタンパク質の機能低下が示された。

【研究2 著明なインスリン抵抗性またはインスリン分泌不全を認める糖尿病患者を対象とした糖代謝異常関連遺伝子についてのパネル解析】

1. 単一遺伝子異常に伴う糖尿病である **monogenic diabetes** が疑われ、インスリン分泌不全

またはインスリン抵抗性を認めたがサンガーシーケンス法で変異が同定されなかった 6 名の患者と、以前にサンガー法で疾患の原因変異が同定された 2 名の患者を対象として、**monogenic diabetes** の既知の原因遺伝子や 1 型糖尿病・2 型糖尿病の関連遺伝子等の合計 228 個の糖代謝関連遺伝子を使用し、NGS を用いた遺伝因子解析を行った。サンガー法によって以前に疾患の原因変異が同定されていた若年発症成人型糖尿病 (MODY) の患者 2 名に関して、パネル解析によって原因変異を正確に同定できることを確認し、本研究におけるパネル診断により確かに変異を同定できることの確証が得られた。

2. 高インスリン血症、インスリン抵抗性を認める症例では、以前 *INS* 遺伝子についてサンガーシーケンスを行い変異を同定できなかったが、本研究でパネル解析を行い、*INSR* 遺伝子における既報の変異が同定され、同変異は疾患の原因と考えられた。また、パネル解析にて疾患の原因変異が確定できなかった患者においても、一部の症例については原因変異の候補の絞り込みの結果、*WFS1* 遺伝子、*LGR5* 遺伝子、*CTRB1* 遺伝子、*BBS12* 遺伝子等に疾患の原因候補と考えられるバリエーションが同定された。

以上、本論文は遺伝性が疑われる糖尿病・糖代謝異常の患者を対象とし、サンガー法に加えて、次世代シーケンサーによる全エクソーム解析および 228 個の糖代謝関連遺伝子パネルを用いた解析にて包括的な原因変異探索を実施した。解析により 5 検体の原因変異を同定し、うち 4 検体は新規変異であった。さらにインスリンシグナルにおいて重要なインスリン受容体遺伝子について、変異箇所のドメインと重症度の関連を解析し、最重症臨床病型の変異が **fibronectin type III** ドメインに集積していることも明らかにした。また機能解析を行い、同領域の一部変異によるタンパク質の機能低下を確認した。本研究の結果は、早期診断と治療法選択への活用を目指した次世代シーケンサーによる包括的な遺伝因子解析が有用となりうることを示し、**monogenic diabetes** の遺伝因子解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。